

① 日本国特許庁 (JP)

② 特許出願公開

③ 公開特許公報 (A)

昭57-4922

④ Int. Cl.³

A 61 K 31/70

35/74

// C 07 H 3/06

C 08 B 37/00

識別記号

ADD

庁内整理番号

6617-4C

7138-4C

7252-4C

6755-4C

⑤ 公開 昭和57年(1982)1月11日

発明の数 2

審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑥ 血中アンモニア低下剤

⑦ 特 願 昭55-78384

⑧ 出 願 昭55(1980)6月12日

⑨ 発 明 者 務台方彦
東大和市清水4の988

⑩ 発 明 者 黒田彰夫
西宮市愛宕山13-10

⑪ 発 明 者 高橋徳太郎
東京都西多摩郡日の出町平井21
96-552

⑫ 発 明 者 田中隆一郎
立川市若葉町2-38-8

⑬ 発 明 者 遠山清
神奈川県津久井郡城山町川尻39
65-7

⑭ 発 明 者 志賀寿造
西宮市塩瀬町生瀬115-10

⑮ 出 願 人 株式会社ヤクルト本社
東京都港区東新橋1丁目1番19
号

⑯ 代 理 人 弁理士 板井一瑞

明 細 書

1. 発明の名称 血中アンモニア低下剤

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式 $\text{Gal}-(\text{Gal})_n-\text{Glc}$ (但し式中 Gal はガラクトース残基、Glc はグルコース残基、 n は 1~4 の整数を、それぞれ表わす) で示されるオリゴ糖を有効成分とする血中アンモニア低下剤。

(2) 一般式 $\text{Gal}-(\text{Gal})_n-\text{Glc}$ (但し式中 Gal はガラクトース残基、Glc はグルコース残基、 n は 1~4 の整数を、それぞれ表わす) で示されるオリゴ糖及びビフィドバクテリウム菌を有効成分とする血中アンモニア低下剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明はビフィドバクテリウム菌の増殖促進物質を必須有効成分とする新規な血中アンモニア低下剤に関するものである。

血液中に存在するアンモニアは、体内の代謝により発生したものと腸から吸収されたものとがあるが、肝臓に入るなどして障害を起こす遊離アンモニアの大部分は、後者の腸管由来のアンモニアであるとされている。腸管内にアンモニアが発生するのは、食餌性アミノ酸及び腸管へ排泄された尿素が、腸内細菌によりアンモニアにまで分解されるためである。

このような血中アンモニアの量が異常に多いとき、これを直接又は間接的に低下させることにより高アンモニア血症を予防又は治療し、あるいは肝臓障害患者の肝機能負担を軽減する血中アンモニア低下剤としては、従来非吸収性の抗生物質、ラクチュロース、生菌製剤、NHA・ブリティドロキサム酸等のクレアゼ阻害剤などが知られている。しかしながら、これらは安全性や有効性において、一長一短あるものであった。

ところで本発明者らは、腸内細菌叢に関する研究の過程で、腸内常在細菌の一種であるビフィドバクテリウム菌を腸内に特異的に増殖させると腸

管内アンモニアやインドールが顕著に低下することを知った。本発明は、かかる知見及びビフィドバクテリウム菌増殖促進物質 TOS に関する別の発明に基づいて完成されたものであって、腸管内におけるアンモニアの生成を抑制することにより血中アンモニアを低下させる血中アンモニア低下剤として、一般式 $\text{Gal}-(\text{Gal})_n-\text{Glc}$ で示されるオリゴ糖を有効成分とするもの、並びに上記オリゴ糖とビフィドバクテリウム菌を有効成分とするものの二つを提供するものである(但し上式において Gal はガラクトース残基、Glc はグルコース残基、 n は 1~4 の整数を、それぞれ表わす。))。

本発明によるアンモニア低下剤の必須有効成分である上記オリゴ糖(以下 TOS という)は腸内におけるビフィドバクテリウム菌の増殖を著しく促進し、その結果、前記機構により腸内アンモニア、ひいては血中アンモニアを低下させるのである。

ビフィドバクテリウム菌増殖促進物質としての

反応初期にはグルコース、ガラクトース及びオリゴ糖がほぼ直線的に増加するが、その後はいずれもやや複雑な曲線を描き、オリゴ糖はある時点から徐々に減少する傾向を示す。オリゴ糖の収率が最大になる時間は他の反応条件によって異なるから、最適反応時間は実験により確認することが望ましい。

なお反応混合物中のオリゴ糖は、例えば薄層クロマトグラフィーにより他の成分と分離した後、Anthrone 法によって定量することができる。

酵素反応は処理液を約 90℃ 以上に 5~10 分加熱することにより停止させることができる。

酵素処理を終った反応混合物はそのまま適宜濃縮し更に乾燥して粉末化したものを本発明の医薬の構成成分として利用してもよいが、有効成分であるオリゴ糖濃度を高めるための精製を行うことが望ましい。精製は種々の方法で行うことができるが、例えば反応混合物をイオン交換樹脂で処理して予備的に精製した後、活性炭カラムに通してこれにオリゴ糖を吸着させ、次いでアルコール水

TOS 及びその製造法の発明についてはさきに特許出願(特願昭 54-12837 号)したが、TOS の多くは文献未載の化合物なので、以下これについてやや詳細に説明する。

前述のように、TOS は β -ガラクトシダーゼでラクトースを処理すると生成するオリゴ糖である。この方法によって TOS を製造する場合、 β -ガラクトシダーゼで処理するラクトースは特に高純度のものを用いる必要はなく、通常市販されているものをそのまま使用することができる。また全乳、脱脂乳のようにラクトースを一成分として含有する物質も原料として用いることができる。 β -ガラクトシダーゼとしては、アスペルギルス・オリゼの生産したものが好ましい。

酵素処理を行う場合、基質濃度は 10~50 % 程度、pH は 3~6.5、酵素濃度は 1~100 units/ml、温度は 20~50℃ が適当である。

反応時間はオリゴ糖の収率に大きな影響を及ぼす。酵素処理の一例における反応時間と生成糖類の量との関係を示す第 1 図から明らかなように、

溶液で溶出させる方法がある。又反応混合物に単糖類及び 2 糖類を質化する微生物を接種し培養して単糖類及び 2 糖類を消費させることによりオリゴ糖の単離を容易にする方法もある。

以上のようにして製造されたオリゴ糖混合物の形の TOS は、その経理半量が 3 糖類であり、4 糖類が約 1/3、残りが他の多糖類である。またこれらのオリゴ糖におけるガラクトース-ガラクトース間結合は β -1, 3 結合、 β -1, 4 結合又は β -1, 6 結合であって β -1, 6 結合が主であり、ガラクトース-グルコース間結合は β -1, 3 結合、 β -1, 4 結合又は β -1, 6 結合であって β -1, 4 結合が主であることが確認されている。

しかしながら、これらのオリゴ糖は、単離されたものについて検討した限りにおいて、個々のオリゴ糖単独でもビフィドバクテリウム菌増殖促進因子として働き、したがって本発明の医薬の構成成分として使用することができる。

なお TOS の毒性については、ICR 系マウス、

Wistar系ラット雌雄各40匹を用いて、経口投与により急性毒性試験を行なったが、LD₅₀はいずれも15g/kg以上であり、異常は認められなかった。

TOSは、それ単独で服用しても、腸内常在性ビフィドバクテリウム菌を特異的に増殖させて腸管内アンモニア発生量の低減に貢献するが、TOSに適量のビフィドバクテリウム菌末を併用するときは、上記機構によるアンモニア発生の抑制は一層効果的に行われる。

TOSと共に用いるビフィドバクテリウム菌末としては、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(例えば微工研菌寄第3906号、ATCC 15700等)、同ロンガム(例えばATCC 15707)、同アドレスセンティス(例えばATCC 15703)、同インファンティス(例えばATCC 15697)、などの常法による凍結乾燥菌末を用いることができる。また製剤化のための賦形剤としては、デンプン、ヒドロキシプロピルセルロースなどが適当であり、生菌数は 1×10^8 個/g以上とすることが望ましい。

が 10^8 個/日以上の場合には、上記TOS単用剤の場合よりもTOS服用量を減らしてもよい。

以下試験例及び実施例を示して本発明を説明する。なお各例中、「B菌」とあるのはビフィドバクテリウム菌を意味する。

実施例 1

3.6kgのラクトースを約6ℓの温水に溶解し、1M-酢酸緩衝液(pH 4.6) 50ml、β-ガラクトシダーゼ10万単位及び水を加えて10ℓとし、37℃で5時間反応させた。次いで反応液を加熱して酵素を不活性化させ、変性タンパク質を分別した後、陽イオン交換樹脂及び陰イオン交換樹脂のカラムを通した。通過液は30×30cmの活性炭充填カラムに一夜接触させ、その後活性炭を脱イオン水60ℓで水洗いして単糖類を溶出した後、5%エタノール60ℓ、次いで50%エタノール60ℓで溶出した。この50%エタノール溶出区分を約7ℓに濃縮し、孔径0.2μmのメンブランフィルターで無菌ろ過した後、再度イオン交換、減圧濃縮、ろ過を行ない、ろ液を凍結乾燥して白

い。

ビフィドバクテリウム菌の安全性はWistar系ラット雌雄を用いた更急性毒性試験を行なって確認されており、菌投与ラットの一般症状、体重の変化、飼料摂取量、血液学的検索、血清学的検索、尿検査、臓器重量測定、剖検及び病理組織学的検索のすべてにおいて、異常を認めなかった。

本発明の第2におけるTOSとビフィドバクテリウム菌の配合比は、生菌数約 1×10^8 /gの菌末の場合で、TOS 100重量部当り菌末5~30重量部とすることが望ましい。但し、両者は一緒に製剤化する必要はなく、別個に散剤、顆粒、錠剤等として包装しておき、服用時に適宜併用するようにしても差支えない。

本発明の血中アンモニア低下剤は、TOS単用の場合、成人1日当り2~10gを2~4日間又はそれ以上の期間、経口服用すればよい。TOSとビフィドバクテリウム菌の併用剤の場合は、ビフィドバクテリウム菌生菌数が成人1日当り 10^8 ~ 10^{10} 個となるよう服用するとよい。なお生菌数

色のTOS粉末を得た。このTOSは3糖類55%、4糖類32%、その他13%からなるものであった。これを粉砕機にて粉砕混合し、分包充填機にてアルミ分包し、TOS製剤を製造した。

実施例 2

実施例1と同様にして製造したTOS粉末を水に溶解し、加熱殺菌後濃縮し、濃度50~80%のシロップ剤とする。またはそのまま、あるいは少量のヒドロキシプロピルセルロースを加え、顆粒剤とする。またこれにステアリン酸マグネシウムを滑沢剤として加え打錠し、TOS錠剤とする。

実施例 3

ビフィドバクテリウム・ブレーベYIT 4006(微工研菌寄第3906号)をVL-G培地にて48時間培養後、遠心分離機により集菌した。この後分散液を加え凍結乾燥した菌体を水に懸濁し、生菌数を 1×10^8 /mlに調整した。

実施例 4

実施例3と同様にして得た菌体をデンプンと混合して生菌数を $1 \sim 2 \times 10^8$ /gに調整し、次に

ヒドロキシプロピルセルロースを加えて練合し、造粒機にて顆粒剤とした後、アルミ分包してビフィドバクテリウム菌末製剤を得た。

これに実施例2と同様にして製造したTOS顆粒剤を85重量%に混合しTOSとビフィドバクテリウム菌との混合顆粒剤を製造した。

試験例 1

健康成人16人に対し、次のような実験を行なった。用いたTOSとB菌液は、実施例1および8の方法で調製したものである。またTOSは微細粉に溶解し、経口投与した。

〔実験設定〕

(1)群：TOSのみ投与群（5例）

スケジュール

1週目………TOS無投与

2週目………TOS（3g/日）を投与

3週目………TOS（10g/日）を投与

(2)群：B菌液とTOSの併用投与群（5例）

スケジュール

1週目………B菌液（1ml/日）のみ投与

とし、各々経口投与した。

〔実験設定〕

I群：TOSとB菌液の併用投与群（投与量

TOS 1.5g/日、菌液 3ml/日）

II群：TOSのみ投与群（投与量 TOS 1.5g/日）

III群：無投与群

IV群：無処置群

上記I～III各群の全ラットは卵白を食餌に20%添加した高蛋白食飼育を行なった。IV群は通常食餌にて飼育した。

測定：上記実験設定のもとに4週間飼育した後、全ラットの門脈血および盲腸内容物を採取しアンモニア量を測定した。

実験結果は表1のとおりであって、高蛋白食飼育を行うことにより、通常食飼育を行なったIV群に比べ有意な門脈血中アンモニア量の上昇がみられた。門脈血中アンモニアの低下作用はTOSとB菌液の併用投与群、TOSのみ投与群の順で高く、有意な低下効果が認められた。また盲腸内容

と

2週目………B菌液（1ml/日）及び

TOS（3g/日）を投与

3週目………B菌液（1ml/日）及び

TOS（10g/日）を投与

(3)群：B菌液のみ全期間投与群（6例）

測定：各週3日目、5日目及び7日目に、各人の糞便中のアンモニア含量と尿中のインジカン量を測定し、その週における平均値を求めた。

結果は第2図及び第3図のとおりであって、TOSの投与により糞便中のアンモニア含量、および早期尿中のインジカンの低下が認められる。またTOSとB菌の併用投与は、TOS単独投与よりも有効であることが認められた。

試験例 2

SD系成熟雄ラット1群6匹を用いてTOSの投与試験を行なった。用いたTOSとB菌液は実施例1と3で調製したもので、TOSは微細粉に20重量%溶解し、B菌液は生菌数 1×10^8 /ml

物のアンモニア量についても測定したところ、同様の結果が得られ、TOS単独、あるいはTOSとB菌の併用投与により腸管内のアンモニア産生を抑制し、血中のアンモニア量を低下し得ることが認められた。

表 1

測定項目	門脈血中アンモニア濃度	盲腸内容物中アンモニア濃度
I	232.6 ± 35.7	641.2 ± 154.1
II	283.0 ± 55.8	671.9 ± 241.6
III	458.4 ± 109.2	1808.5 ± 696.5
IV	270.3 ± 56.8	894.9 ± 265.3

※ 平均値 ± SD

4. 図面の簡単な説明

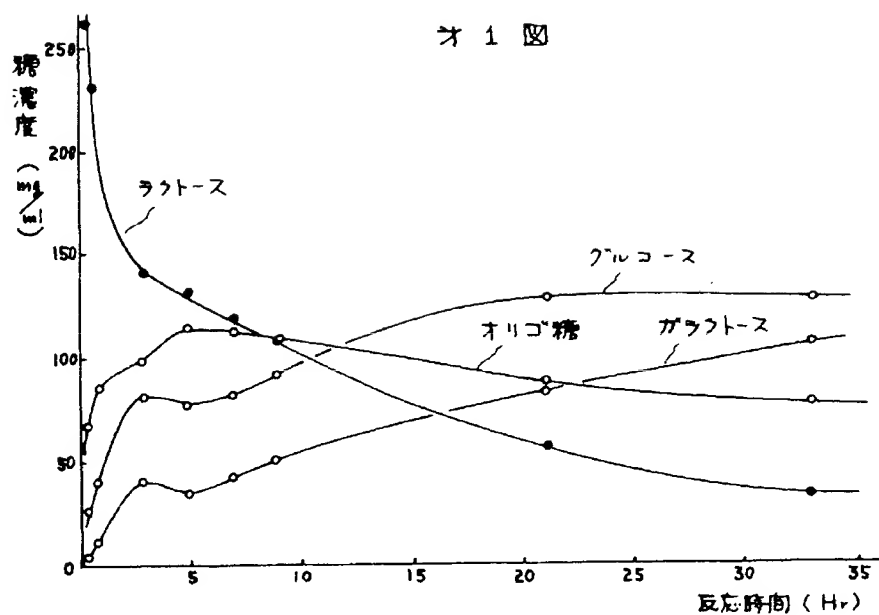
第1図はラクトースをβ-ガラクトシダーゼで処理したときの変化を示すグラフである。

第2図及び第3図はいずれも試験例1及び3に

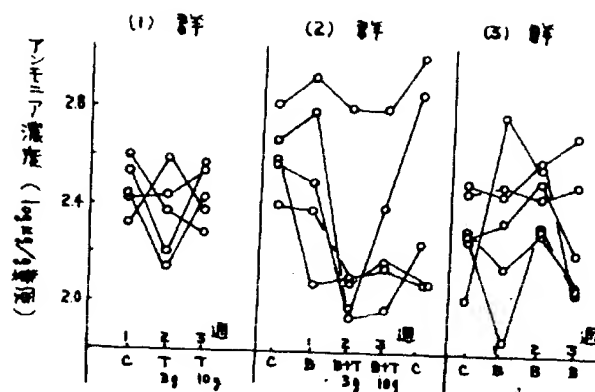
おける測定結果を示すグラフである。

- C : 無投与
 T : TOS投与
 B : B菌投与
 B + T : B菌及びTOSを投与

代理人 弁理士 坂井 一 雄



才 2 図



才 3 図

